

## AGRADECIMENTOS

Esta tese simboliza o término de mais uma etapa da minha vida académica, e sem as pessoas que me apoiaram não seria possível chegar até aqui. Se houver algum nome em falta não foi intencional, pois jamais serão esquecidas.

Em especial, quero agradecer à **Prof. Dr. M.<sup>a</sup> Teresa Dinis**, sem o seu apoio nada disto teria sido possível. Grata pela coragem e incentivo em ir para Cádiz, considero que foi muito importante para mim, proporcionando-me uma experiência única quer a nível pessoal como profissional, principalmente porque fui integrada num projecto que me obrigou a desenvolver e aperfeiçoar técnicas laboratoriais.

Também quero agradecer à **Dr.<sup>a</sup> Carmen Sarasquete** e **Dr. Juan Bosco** por me terem aceite no CSIC e integrado num projecto enriquecedor para mim. Durante a minha estadia em Cádiz transmitiram-me a sua experiência e conhecimentos que me foram úteis para o desenvolvimento deste trabalho.

Não posso deixar de mencionar a **Técnica Isa** que com a sua calma e experiência me ensinou e ajudou a melhorar a execução das técnicas utilizadas na tese. A estudante espanhola **Bea** foi igualmente amável por me ajudar na manutenção dos tanques e alimentação dos peixes. Os esclarecimentos facultados pela **Thaís** foram muito úteis no desenrolar do projecto.

Ao longo dos meses que estive em Cádiz tive a oportunidade de conhecer a **Dulce, Cristiano, Thaís, Sara, Vânia, Andrew, Filipa** e **Vittoria**, com quem passei bons momentos e que me ajudaram a superar e relaxar nos dias mais difíceis.

Agradeço aos amigos “tugas” que conheci durante o meu percurso académico, dentro dos quais destaco a **Anabela, Lúcia, Inês, Joana “Coelhita”, Lena, Sandra** e que proporcionaram momentos muito divertidos/animados cheios de gargalhadas.

Ao longo dos últimos anos, uma amiga metade “tuga” metade “moçamba” teve uma presença marcante na minha vida e não podia ser esquecida. **Polyana Silva** mais conhecida como “Cotinha” no lote 7, foi uma pessoa muito especial que esteve sempre a

meu lado nos bons e maus momentos... “puxou-me as orelhas” quando mais precisei, mas também tinha sempre um sorriso para me animar... Enfim, é como se fosse uma irmã mais velha.

Aos pais da Polyana, **Sr. Carlos** e **D. Suzana**, agradeço todo o carinho e preocupação comigo. Apesar da distância conseguimos construir laços fortes que nos unem como sendo da mesma família. À **avó Maria** um grande obrigado por ser a minha avó adoptiva.

O meu **padrinho** Ricardo e **madrinha** Celeste foram pessoas muito especiais ao longo da minha vida, principalmente quando fui estudar para Faro. Apesar de actualmente estarmos distantes, terão sempre um cantinho guardado no meu coração.

Agradeço a toda a minha família por estarem sempre ao meu lado.

Por último, quero agradecer às pessoas mais importantes na minha vida, à minha **mamã, manita, cunhado** e **sobrinho**. Sem eles não seria possível alcançar mais esta etapa na minha vida e muito menos superar os maus momentos quando fiquei doente. Obrigada pelo vosso amor, carinho e compreensão. E não pensem que me esqueci das noites para eu terminar a tese dentro do prazo. Adoro-vos!

**Papá...** apesar de já não estares connosco, eu sinto que estás sempre a meu lado.

# ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS	i
ÍNDICE GERAL	iii
ÍNDICE DE TABELAS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Contaminantes Ambientais e Interacção com o Ecossistema	2
1.2. Citocromo CYP1A como Biomarcador de Xenobióticos	3
1.3. Indução de CYP1A e Biomonitorização Ambiental	5
1.4. Avaliação dos Efeitos Biológicos dos Xenobióticos: Indução de CYP1A e Alterações Histopatológicas	6
1.5. Objectivos	8
2. MATERIAL E MÉTODOS	10
2.1. Exposição aos Xenobióticos	11
2.2. Análise Histológica	12
2.2.1. Técnicas Histomorfológicas	13
2.2.1.1. Hematoxilina de Harris – Eosina (H-E)	13
2.2.1.2. Hematoxilina de Harris – VOF (H-VOF)	14
2.2.2. Técnicas Histoquímicas de Carbohidratos	14
2.2.2.1. Azul de Alcian	14
2.2.2.2. Ácido Periódico – Schiff (PAS)	14
2.2.2.3. Diastase – PAS	14
2.2.3. Técnicas Histoquímicas de Proteínas	15
2.2.3.1. Azul de Bromofenol – Hg	15
2.2.3.2. P-Dimetilaminobenzaldeído	15
2.2.3.3. 1,2- Naftoquinona-4-Sulfonato Sódico (NQS)	15
2.2.3.4. Ferricianuro de Potássio – Ferro III	15
2.2.3.5. Tioglicerol – Ferricianuro de potásio – Ferro III	15
2.2.3.6. Ninhidrina – Schiff	16
2.2.3.7. Sulfato de Mercúrio – Ácido Sulfúrico – Nitrito de Sódio	16
2.3. Imunohistoquímica CYP1A	16
2.4. Análise Estatística	17

3. RESULTADOS	19
3.1. Histopatologia	20
3.1.1. Brânquias	20
3.1.1.1. Aspectos Histológicos	20
3.1.1.2. Benzo(a)pireno	21
3.1.1.3. Naftaleno	21
3.1.2. Fígado	22
3.1.2.1. Aspectos Histológicos	22
3.1.2.2. Benzo(a)pireno	22
3.1.2.3. Naftaleno	23
3.1.3. Pâncreas Exócrino	24
3.1.3.1. Aspectos Histológicos	24
3.1.3.2. Benzo(a)pireno	24
3.1.3.3. Naftaleno	24
3.1.4. Tracto Gastrointestinal	25
3.1.4.1. Aspectos Histológicos	25
3.1.4.2. Benzo(a)pireno	26
3.1.4.3. Naftaleno	26
3.1.5. Rins	27
3.1.5.1. Aspectos Histológicos	27
3.1.5.2. Benzo(a)pireno	28
3.1.5.3. Naftaleno	28
3.2. Distribuição Imunohistoquímica de CYP1A	34
3.2.1. Indução de CYP1A	34
3.2.1.1. Brânquias	34
3.2.1.2. Fígado	35
3.2.1.3. Pâncreas Exócrino	36
3.2.1.4. Tracto gastrointestinal	36
3.2.1.5. Rins	37
3.2.2. Relação entre as Lesões Histopatológicas e a Indução de CYP1A	44
3.3. Distribuição de Carbohidratos e Proteínas	46
3.3.1. Brânquias	46
3.3.1.1. Carbohidratos	46
3.3.1.2. Proteínas	46
3.3.2. Fígado e Pâncreas Exócrino	49
3.3.2.1. Carbohidratos	49
3.3.2.2. Proteínas	49
3.3.3. Intestino	52
3.3.3.1. Carbohidratos	52

3.3.3.2. Proteínas	52
3.3.4. Rins	55
3.3.4.1. Carbohidratos	55
3.3.4.2. Proteínas	55
4. DISCUSSÃO	58
4.1. Histopatologia	59
4.2. Distribuição Imunohistoquímica de CYP1A	64
4.3. Distribuição de Carbohidratos e Proteínas	70
5. CONCLUSÃO	75
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78
ANEXOS - Soluções e Técnicas Histológicas e Imunohistoquímicas	84

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 3.1.</b> Técnicas histoquímicas de carboidratos e proteínas em juvenis de <i>Sparus aurata</i> .	13
<b>Tabela 3.1.</b> Coeficiente de correlação ( $r^2$ ) da análise de regressão linear entre as lesões histopatológicas e a indução de CYP1A em brânquias, fígado, pâncreas exócrino, tracto gastrointestinal e rins de juvenis de <i>Sparus aurata</i> expostos a benzo(a)pireno e naftaleno, durante 15 dias.	44
<b>Tabela 3.2.</b> Distribuição de carboidratos nas brânquias de juvenis de <i>Sparus aurata</i> dos tratamentos controlo e expostos às diferentes concentrações de benzo(a)pireno e naftaleno, durante os 15 dias de exposição.	47
<b>Tabela 3.3.</b> Distribuição de proteínas nas brânquias de juvenis de <i>Sparus aurata</i> dos tratamentos controlo e expostos às diferentes concentrações de benzo(a)pireno e naftaleno, durante os 15 dias de exposição.	48
<b>Tabela 3.4.</b> Distribuição de carboidratos no fígado de juvenis de <i>Sparus aurata</i> dos tratamentos controlo e expostos às diferentes concentrações de benzo(a)pireno e naftaleno, durante os 15 dias de exposição.	50
<b>Tabela 3.5.</b> Distribuição de proteínas no fígado de juvenis de <i>Sparus aurata</i> dos tratamentos controlo e expostos às diferentes concentrações de benzo(a)pireno e naftaleno, durante os 15 dias de exposição.	51
<b>Tabela 3.6.</b> Distribuição de carboidratos no intestino de juvenis de <i>Sparus aurata</i> dos tratamentos controlo e expostos às diferentes concentrações de benzo(a)pireno e naftaleno, durante os 15 dias de exposição.	53
<b>Tabela 3.7.</b> Distribuição de proteínas no intestino de juvenis de <i>Sparus aurata</i> dos tratamentos controlo e expostos às diferentes concentrações de benzo(a)pireno e naftaleno, durante os 15 dias de exposição.	54
<b>Tabela 3.8.</b> Distribuição de carboidratos nos rins de juvenis de <i>Sparus aurata</i> dos tratamentos controlo e expostos às diferentes concentrações de benzo(a)pireno e naftaleno, durante os 15 dias de exposição.	56
<b>Tabela 3.9.</b> Distribuição de proteínas nos rins de juvenis de <i>Sparus aurata</i> dos tratamentos controlo e expostos às diferentes concentrações de benzo(a)pireno e naftaleno, durante os 15 dias de exposição.	57

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.1.</b> Indução de CYP1A mediada por um receptor citosólico de aril hidrocarbono (AhR).	5
<b>Figure 1.2.</b> Hierarquia taxonómica e ilustração de um adulto da espécie <i>Sparus aurata</i> .	8
<b>Figura 3.1.</b> Índice de alterações histopatológicas em relação às concentrações subletais de benzo(a)pireno e naftaleno (A) e ao tempo de exposição (B), das brânquias de juvenis de <i>Sparus aurata</i> .	20
<b>Figura 3.2.</b> Índice de alterações histopatológicas em relação às concentrações subletais de benzo(a)pireno e naftaleno (A) e ao tempo de exposição (B), do fígado de juvenis de <i>Sparus aurata</i> .	23
<b>Figura 3.3.</b> Índice de alterações histopatológicas em relação às concentrações subletais de benzo(a)pireno e naftaleno (A) e ao tempo de exposição (B), do pâncreas exócrino de juvenis de <i>Sparus aurata</i> .	25
<b>Figura 3.4.</b> Índice de alterações histopatológicas em relação às concentrações subletais de benzo(a)pireno e naftaleno (A) e ao tempo de exposição (B), do tracto gastrointestinal de juvenis de <i>Sparus aurata</i> .	26
<b>Figura 3.5.</b> Índice de alterações histopatológicas em relação às concentrações subletais de benzo(a)pireno e naftaleno (A) e ao tempo de exposição (B), dos rins de juvenis de <i>Sparus aurata</i> .	27
<b>Figura 3.6.</b> Morfologia de juvenis de <i>Sparus aurata</i> do controlo.	29
<b>Figura 3.7.</b> Alterações histopatológicas em juvenis de <i>Sparus aurata</i> expostos a benzo[a]pireno (0.9 µM).	30
<b>Figura 3.8.</b> Alterações histopatológicas em juvenis de <i>Sparus aurata</i> expostos a benzo[a]pireno (8.1 µM).	31
<b>Figura 3.9.</b> Alterações histopatológicas em juvenis de <i>Sparus aurata</i> expostos a naftaleno (0.9 µM).	32
<b>Figura 3.10.</b> Alterações histopatológicas em juvenis de <i>Sparus aurata</i> expostos a naftaleno (8.1 µM).	33
<b>Figura 3.11.</b> Índice de indução de CYP1A em relação às concentrações subletais de benzo(a)pireno e naftaleno (A) e ao tempo de exposição (B), das brânquias de juvenis de <i>Sparus aurata</i> .	34
<b>Figura 3.12.</b> Índice de indução de CYP1A em relação às concentrações subletais de benzo(a)pireno e naftaleno (A) e ao tempo de exposição (B), do fígado de juvenis de <i>Sparus aurata</i> .	35
<b>Figura 3.13.</b> Índice de indução de CYP1A em relação às concentrações subletais de benzo(a)pireno e naftaleno (A) e ao tempo de exposição (B), do pâncreas exócrino de juvenis de <i>Sparus aurata</i> .	36

<b>Figura 3.14.</b> Índice de indução de CYP1A em relação às concentrações subletais de benzo( <i>a</i> )pireno e naftaleno (A) e ao tempo de exposição (B), do intestino de juvenis de <i>Sparus aurata</i> .	37
<b>Figura 3.15.</b> Índice de indução de CYP1A em relação às concentrações subletais de benzo( <i>a</i> )pireno e naftaleno (A) e ao tempo de exposição (B), dos rins de juvenis de <i>Sparus aurata</i> .	38
<b>Figura 3.16.</b> Imunoreactividade de CYP1A em juvenis de <i>Sparus aurata</i> do controlo.	39
<b>Figura 3.17.</b> Localização imunohistoquímica/indução de CYP1A em juvenis de <i>Sparus aurata</i> expostos a benzo[ <i>a</i> ]pireno (0.9 µM).	40
<b>Figura 3.18.</b> Imunoreactividade de CYP1A em juvenis de <i>Sparus aurata</i> expostos a benzo[ <i>a</i> ]pireno (8.1 µM)	41
<b>Figura 3.19.</b> Localização imunohistoquímica/indução de CYP1A em juvenis de <i>Sparus aurata</i> expostos a naftaleno (0.9 µM).	42
<b>Figura 3.20.</b> Localização imunohistoquímica/indução de CYP1A em juvenis de <i>Sparus aurata</i> expostos a naftaleno (8.1 µM).	42
<b>Figura 3.21.</b> Correlação entre o índice de lesão histopatológica e o índice de indução de CYP1A em brânquias, fígado, pâncreas exócrino, tracto gastrointestinal e rins de juvenis de <i>Sparus aurata</i> expostos a benzo( <i>a</i> )pireno e naftaleno, durante 15 dias.	45

## LISTA DE ABREVIATURAS

AhR	Receptor aril-hidrocarbono
ANOVA	Análise de variância
Arg	Arginina
B[a]P	Benzo[a]pireno
B(a)P 0.9	0.9 $\mu$ M de benzo(a)pireno
B(a)P 8.1	8.1 $\mu$ M de benzo(a)pireno
BSA	Albumina de soro bovino
CanB	Canalículos biliares
CelAc	Células acinar
CelCa	Células calciformes
CelE	Células epiteliais
CelP	Células pilar
CelM	Células mucosas
Cis	Cisteína
Cist	Cistina
cm	Centímetro
ConB	Conductos biliares
Ct	Controlo
CYP1A	Citocromo P450
DAB	3,3'-diaminobenzidina tetrahidrocloro
DesE	Descamação epitelial
DiV	Dilatação das vilosidades
DMSO	Dimetil sulfóxido
DT	Dilatação tubular
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
Ench	Encolhimento dos hepatócitos
EndV	Endotélio vascular
Ent	Enterócitos
EpiTR	Epitélio dos túbulos renais
EROD	7-Ethoxyresorufin- <i>O</i> -deethylase
Es	Estancamento sanguíneo
Ex	Extravasação sanguínea
FAC	Focus de alteração celular
FusL	Fusão das lamelas secundárias
g	Grama

G	Glucogénio
Glo	Glomérulo
H-E	Hematoxilina e eosina
Hep	Hepatócito
Hip	Hiperplasia
H-VOF	Hematoxilina e fast green FCF, orange G e fucsina ácida
LamP	Lâmina própria
LC50	Concentração letal de um químico que mata 50% da amostra da população
Lis	Lisina
M	Molar
MC	Mucopolisacarídeos carboxilados
mg	Miligramas
mg/L	Miligramas por litro
ml	Mililitros
MN	Mucopolisacarídeos neutros
MS	Mucopolisacarídeos sulfatados pouco ionizados
MSI	Mucopolisacarídeos sulfatados muito ionizados
Mus	Muscular
N[a]P	Naftaleno
N(a)P 0.9	0.9 $\mu\text{M}$ de naftaleno
N(a)P 8.1	8.1 $\mu\text{M}$ de naftaleno
Nec	Necrose
NQS	Naftoquinona-4-sulfonato sódico
P	Proteínas em geral
PAHs	Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos
PAS	Ácido periódico – Schiff
PCBs/PBBs	Bifenis polihalogenados
PCDDs	Dibenzo- <i>p</i> -dioxinas policloradas
PCDFs	Dibenzofuranos
PBS	Tampão fosfato
PHAHs	Hidrocarbonetos aromáticos polihalogenados
PicN	Picnose nuclear
RCA	Retracção das células acinar
Re	Retracção da lâmina própria/submucosa
ReG	Retracção do glomérulo e incremento do espaço da cápsula de Bowman
RTH	Redução do tecido hematopoiético intersticial
RT-PCR	Reacção da Transcriptase reversa, seguida da reacção da polimerase em cadeia

Sin	Sinusóides
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
TCDD	2,3,7,8-Tetraclorodibenzo- <i>p</i> -dioxina
TecH	Tecido hematopoiético
Tel	Telangiectasia
Tir	Tirosina
Vac	Vacuolização
VacH	Vacuolização citoplasmática dos hepatócitos
VacTR	Vacuolização das células dos túbulos renais
$\mu\text{M}$	Micromolar
$\mu\text{L}$	Microlitro

## RESUMO

O objectivo do presente estudo foi a determinação da resposta histopatológica e a indução de CYP1A no fígado, brânquias, rim e tracto gastrointestinal de juvenis de dourada, *Sparus aurata*, expostos a benzo(a)pireno (B[a]P) e naftaleno (N[a]P).

Os juvenis de dourada foram expostos durante 15 dias a diferentes concentrações subletais de PAHs (B[a]P e N[a]P). As amostragens do tratamento controlo e dos tratamentos com os contaminantes foram efectuadas após 24 e 72 horas (curto período de exposição) e 5 e 15 dias (longo período de exposição).

A resposta histopatológica foi analisada através das técnicas clássicas de coloração morfológica. A distribuição celular da proteína CYP1A foi determinada pelo método imunohistoquímico, usando como anticorpo primário o anticorpo monoclonal C10-7 e como anticorpo secundário o anticorpo anti-rato IgG biotilado. Conjuntamente, a distribuição de carboidratos e proteínas foi avaliada através de métodos histoquímicos clássicos.

Alterações histopatológicas foram localizadas nos órgãos alvo dos exemplares expostos a ambos os contaminantes. Nos tratamentos com B[a]P e N[a]P, as lesões histopatológicas apresentaram dependência com a concentração e o tempo de exposição, indicando maior índice de lesão nos peixes amostrados no final do período experimental (15 dias).

As lesões histopatológicas foram mais pronunciadas para N[a]P do que B[a]P no final do período de exposição. Contrariamente, os valores de CYP1A foram superiores para B[a]P no mesmo período experimental, corroborando o papel protector de CYP1A através do metabolismo de compostos tóxicos.

O principal local de indução de CYP1A foi o endotélio vascular. Além disso, os resultados revelaram elevados níveis de indução de CYP1A em três órgãos alvo (fígado, brânquias e rins).

Este estudo confirma a teoria do fígado ser o principal órgão metabólico nos peixes e, apresenta evidências de uma substancial participação das brânquias e rins no metabolismo dos xenobióticos.

*Palavras-chave:* B[a]P, N[a]P, CYP1A, Histopatologia, *Sparus aurata*

## ABSTRACT

The aim of the present study was to determine the histopathological response and the induction response of CYP1A in gills and liver of seabream juvenile specimens, *Sparus aurata*, exposed to benzo(*a*)pyrene (B[*a*]P) and naphthalene (N[*a*]P).

Seabream juveniles were exposed for 15 days to different sublethal concentrations of PAHs (B[*a*]P and N[*a*]P). Samples from the control and exposed treatments were taken at 24 and 72 hours (short term exposition) and 5 and 15 days (long term exposition).

The histopathological response was evaluated by routine morphological staining techniques. Cell and tissue distribution of CYP1A were examined by immunohistochemistry, using a primary monoclonal antibody C10-7 and a biotinylated anti-mouse IgG secondary antibody. Furthermore, the distribution of carbohydrates and proteins was evaluated by classical histochemical methods.

Histopathological alterations were detected in target organs of *S. aurata* exposed to both toxicants. A time and concentration dependency of the histopathological response was detected for B[*a*]P and N[*a*]P treatments, indicating higher index of lesions for fish sampled at the end of the experimental period (15 days).

At the end of the exposure period, histopathological alterations were stronger for N[*a*]P than for B[*a*]P. Interestingly, CYP1A values were higher for B[*a*]P at the same experimental period, corroborating the protective role of CYP1A by metabolizing toxic compounds.

A specific site of CYP1A induction was the vascular endothelium. Furthermore, the results revealed high levels of CYP1A induction in three target organs (liver, gills and kidney).

This study confirms the theory that the liver is the major metabolic organ in fish, and provides evidence for a substantial involvement of gills and kidney in the metabolism of xenobiotics.

*Keywords:* B[*a*]P, N[*a*]P, CYP1A, Histopathology, *Sparus aurata*